

DAS LACTATDEHYDROGENASE-ERHÖHENDE
VIRUS AUS MÄUSEGESCHWÜLSTEN
(RILEY-VIRUS)

- I. SEIN VORKOMMEN IN EINIGEN GESCHWÜLSTEN UND
EINIGE EIGENSCHAFTEN BEI SEINER ÜBERTRAGUNG
(mit 14 Tabellen)

Hartmut Zobl

1965.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DAS LACTATDEHYDROGENASE-ERHÖHENDE
VIRUS AUS MÄUSEGESCHWÜLSTEN
(RILEY-VIRUS)

I. SEIN VORKOMMEN IN EINIGEN GESCHWÜLSTEN UND
EINIGE EIGENSCHAFTEN BEI SEINER ÜBERTRAGUNG
(mit 14 Tabellen)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hartmut Zobl
aus München

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Professor Dr. O. HUG
Berichterstatter:	Dr. A. GEORGII
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.1965



MEINEN ELTERN GEWIDMET

1. Die Geburt des Kindes	1
2. Die Kindheit	2
3. Die Jugend	3
4. Die Ehe	4
5. Die Eltern	5
6. Die Kinder	6
7. Die Jugend	7
8. Die Ehe	8
9. Die Eltern	9
10. Die Kinder	10
11. Die Jugend	11
12. Die Ehe	12
13. Die Eltern	13
14. Die Kinder	14
15. Die Jugend	15
16. Die Ehe	16
17. Die Eltern	17
18. Die Kinder	18
19. Die Jugend	19
20. Die Ehe	20
21. Die Eltern	21
22. Die Kinder	22
23. Die Jugend	23
24. Die Ehe	24
25. Die Eltern	25
26. Die Kinder	26
27. Die Jugend	27
28. Die Ehe	28
29. Die Eltern	29
30. Die Kinder	30
31. Die Jugend	31
32. Die Ehe	32
33. Die Eltern	33
34. Die Kinder	34
35. Die Jugend	35
36. Die Ehe	36
37. Die Eltern	37
38. Die Kinder	38
39. Die Jugend	39
40. Die Ehe	40
41. Die Eltern	41
42. Die Kinder	42
43. Die Jugend	43
44. Die Ehe	44
45. Die Eltern	45
46. Die Kinder	46
47. Die Jugend	47
48. Die Ehe	48
49. Die Eltern	49
50. Die Kinder	50
51. Die Jugend	51
52. Die Ehe	52
53. Die Eltern	53
54. Die Kinder	54
55. Die Jugend	55
56. Die Ehe	56
57. Die Eltern	57
58. Die Kinder	58
59. Die Jugend	59
60. Die Ehe	60
61. Die Eltern	61
62. Die Kinder	62
63. Die Jugend	63
64. Die Ehe	64
65. Die Eltern	65
66. Die Kinder	66
67. Die Jugend	67
68. Die Ehe	68
69. Die Eltern	69
70. Die Kinder	70
71. Die Jugend	71
72. Die Ehe	72
73. Die Eltern	73
74. Die Kinder	74
75. Die Jugend	75
76. Die Ehe	76
77. Die Eltern	77
78. Die Kinder	78
79. Die Jugend	79
80. Die Ehe	80
81. Die Eltern	81
82. Die Kinder	82
83. Die Jugend	83
84. Die Ehe	84
85. Die Eltern	85
86. Die Kinder	86
87. Die Jugend	87
88. Die Ehe	88
89. Die Eltern	89
90. Die Kinder	90
91. Die Jugend	91
92. Die Ehe	92
93. Die Eltern	93
94. Die Kinder	94
95. Die Jugend	95
96. Die Ehe	96
97. Die Eltern	97
98. Die Kinder	98
99. Die Jugend	99
100. Die Ehe	100

I N H A L T

	Seite
A) Einleitung	7
B) Material und Methodik	8
C) Impfgeschwülste	10
LDH-Virus aus dem Mäuseimpftumor Landschütz-Sarkom Sa I	10
1) Verteilung des LDH-Virus in den Tumormäusen	11
2) Bestimmung des Infektionstiter	13
3) Vermehrung des LDH-Virus in fortlaufenden Übertragungen	14
4) Wirkung des LDH-Virus bei 2 verschiedenen Mäuselinien	18
LDH-Virus aus dem Ehrlichschen Ascitestumor	19
1) Wirkung des LDH-Virus auf die Fermenthöhe	19
2) Vermehrung des LDH-Virus in fortlaufenden Übertragungen	20
D) Nachweisversuche von LDH-Virus in spontanen Mäusegeschwülsten	22
1) Nachweisversuche von LDH-Virus in Tumormäusen	22
2) Aktivierungsversuche eines latent vermuteten LDH-Virus	26
E) Die Wirkung von LDH-Virus bei Mäusen mit Spontantumoren	27
1) Synergistischer Effekt zwischen LDH-Virus und Tumorgewebe	28
2) Infektionstiter bei LDH-Virus-infizierten Tumormäusen	31
3) Wirkung von Tumorextrakten plus LDH-Virus auf tumorfrem Mäuse	33
F) Kontrollversuch mit Poliomyelitis- und Polyoma-Virus	34

Literatur

37

Lebenslauf

42

In der klinischen Medizin wurden Fermentänderungen bei Patienten mit malignen Geschwülsten (BIERMANN et al., 3; ERICKSON u. MORALES, 10; HILL u. LEVI, 22; HSIEH u. BLUMENTHAL, 24; SCHWARTZ et al., 56) und Leukämien (BLANCHER et al., 5; TSIRIMBAS et al., 58) beobachtet. An diesen Fermentänderungen war besonders das glykolytische Ferment Lactatdehydrogenase beteiligt (BLANCHER et al., 5; SCHWARTZ et al., 56). MOORE u. WROBLEWSKI (32) fanden Änderungen des Fermentes LDH bei Patienten im Blutserum und in serösen Ergüssen oder Medien, die maligne Geschwülste umspülen.

Die Frage, ob es sich dabei um eine Fermenterhöhung infolge einer Fermentaktivierung, eines gehemmten Fermentabbaus oder einer vermehrten Durchlässigkeit der Zellen handelte (GEORGII, 13) blieb bis jetzt ungeklärt.

Vor einiger Zeit fanden LENTA u. RIEHL (27), MANSO et al. (29) im Serum von Mäusen mit Impfgeschwülsten und FRIEND u. WROBLEWSKI (12), HILL u. JORDAN (21) bei Mäusen mit übertragbaren Leukämien ähnliche Fermentänderungen, die anscheinend vom Tumorwachstum beeinflusst werden. (CRISPENS (7), NOTKINS u. GREENFIELD (35), NOTKINS et al. (36), RILEY u. WROBLEWSKI (52). RILEY et al. (50) entdeckten dabei ein übertragbares Agens, das diese Fermentänderungen im Serum von Tumorstieren und Empfängertieren verursacht.

In den letzten Jahren wurde dieses LDH-Agens in fast allen Transplantationsgeschwülsten und einigen Spontantumoren der Maus gefunden (ADAMS et al., 1; BAYERLE et al., 2; GEORGII et al., 15; GEORGII et al., 16; GEORGII et al., 17; MUNDY u. WILLIAMS, 33; RILEY et al., 50).

In menschlichen Geschwülsten konnte dagegen bisher kein LDH-Agens nachgewiesen werden (CRISPENS, 6).

In dieser Arbeit untersuchten wir das Vorkommen und die Verteilung des LDH-Agens aus dem Ehrlichschen Ascitestumor und dem Landschütz-Sarkom I auf Wirtstieren und Empfängertieren. Weiter wurde das Verhalten des Agens in fortlaufenden Übertragungen auf Mäusen geprüft. Als Nachweis des LDH-Agens wurde die deutliche und anhaltende Erhöhung des Fermentes LDH im Serum von Wirts- und Empfängertieren genommen. Die Berechtigung hierzu wurde früher nachgewiesen (GEORGII, 14; GEORGII et al., 15).

Die Infektiosität des LDH-Agens wurde durch den in Verdünnungsreihen bestimmten Titer ausgedrückt.

Während übereinstimmend in den meisten Transplantationstumoren ein LDH-Agens gefunden wurde, waren die Befunde bei Spontantumoren der Maus widersprechend (GEORGII, 15; MUNDY u. WILLIAMS, 33; NOTKINS, 34; RILEY, 50). Wir untersuchten deshalb, ob in Spontantumoren unserer Mäusestämme das Agens enthalten war. Weiter wurde das Verhalten von LDH-Agens auf Tieren mit Spontantumoren studiert.

Zu Beginn dieser Versuche war noch völlig offen, ob die LDH-erhöhende Wirkung nicht eine allgemeine Folge einer Virusinfektion und -vermehrung war, wofür besonders die Befunde von KELLY u. GREIFF (25) sprachen. Deshalb prüften wir die Wirkung von Poliomyelitis- und Polyoma-Viren auf den Ferment Spiegel von Empfänger-mäusen.

In dieser Arbeit wird an Stelle des von RILEY (49) eingeführten Begriffes "virusartiges Agens" oder der von NOTKINS et al., 36, GEORGII et al., 15 verwendeten Bezeichnung LDH-Agens einfach von LDH-Virus gesprochen. Dies geschieht, weil inzwischen physikalische (NOTKINS u. SOCHAT, 37; RILEY, 44; RILEY, 51; ROWSON, 54) und elektronenmikroskopische Untersuchungen (BLADEN u. NOTKINS, 4) den korpuskulären Nachweis des LDH-Agens geführt haben und wir auf Grund eigener biologischer Nachweise von seiner Virusnatur überzeugt sind (GEORGII et al., 15; GEORGII u. LENZ, 18; GEORGII et al., 19).

ROWSON et al., 53, 54; MAHI et al., 28, sprechen einfach von Riley-Virus.

B. MATERIAL UND METHODIK

Mäusegeschwülste:

Mäusesarkom Sa I (Landschütz). Es wurde 1956 von Graffi übernommen und seit dieser Zeit zunächst auf Inzuchtmäusen des Stammes AB (Agnes Bluhm), später auf Swiss-Mäusen der Linie NMRI/Hann. aus dem Institut für Versuchstierzucht Hannover in Ascitesform gehalten.

Ehrlichscher Mäusetumor. Er wurde 1956 von H. Lettre übernommen und wie das Mäusesarkom I in wöchentlichen Transplantationspassagen auf Mäusen des Stammes NMRI in Ascitesform gehalten.

Beide Tumoren wurden auch in solider Form verwendet. Zu ihrer Gewinnung wurde Nativascites in einer Impfmenge von 0,5 ml auf Empfänger-mäuse subcutan übertragen. Die nach 3 Wochen etwa kirschgroßen soliden Tumoren wurden entnommen und, wie weiter unten angeführt, verarbeitet.

Spontan-tumoren. Es handelte sich um 26 spontane Mammacarcinome und Parotiscarcinome mit der mikroskopischen Struktur von Adenocarcinomen. 24 Tumoren stammten von Mäusen des NMRI/Hann.-Stammes, 4 Tumoren von Mäusen des C3H/Hann.-Stammes.

Kontrollgewebe: Frisch entnommene Organe Leber und Milz von gesunden ausgewachsenen Mäusen des Stammes NMRI.

Viruslösungen als Kontrollen:

- 1) Reinkulturen von Poliomyelitis-Viren des Stammes A, die in Verdünnungsreihen von 1:2 bis 1:16 auf je 3 Mäuse des Stammes NMRI übertragen wurden (Dr. O.

Goetz, Universitätskinderklinik München, Friedrich-Bauer-Stiftung).

- 2) S. E. Polyoma-Virus, das 1960 von Dr. S. E. Stewart übernommen wurde und seither auf Mäuseembryonalkulturen gehalten wird. Als Viruslösungen wurde der Zentrifugatüberstand des Mediums verschiedener Gewebekulturen verwandt.

Herstellung der Impflösungen:

Die genannten Ausgangsgewebe wurden mit Hanks'scher Lösung 4-5fach verdünnt und im Bühler-Homogenisator oder Dispergiergerät Ultra-Turrax bei 20000-30000 Umdrehungen 15 min. in der Kälte homogenisiert. Das Homogenat wurde dann bei 2000-3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugates wurde unter Stickstoffdruck durch Seitz-EK-Filter geschickt. Nach bakteriologischer Prüfung durch Ausimpfen in Merck-Boullionkulturen wurden die fertigen sterilen Impflösungen bis zur Verwendung bei -24 Grad C eingefroren. Grundsätzlich wurde eine Injektionsdosis von 0,3-0,5 ml einer Lösung intraperitoneal gegeben.

Nachweis des LDH-Virus:

Die zu untersuchende Lösung, z. B. steriles zellfreies Tumorfiltrat wurde auf Gruppen von je 4-6 Mäusen übertragen und die Serum-LDH der Tiere teilweise mehrmals bis zu 75 Tagen bestimmt. Als positiver Virusnachweis galt ein Fermentanstieg um 5-fache Werte, d. h. von 20-30 auf 100-150 Büchereinheiten und darüber. Die LDH-Erhöhung mußte dauernd bestehen bleiben.

Übertragungsversuche als Virusnachweis:

Nach Eintritt des Aktivitätsanstieges an LDH im Serum beimpfter Mäuse, zwischen 2. -6. Tag, wurden die Tiere getötet und zellfreie Homogenate der Organe Leber und Milz hergestellt. Diese Tierpassagen wurden wiederholt durchgeführt.

Als positiv wurden nur solche Ergebnisse gewertet, deren erhöhter LDH-Spiegel in Mäusepassagen zellfrei weiterinduziert werden konnte. Ein Anstieg der Serum-LDH auf fünffache Normwerte, also auf über 100 Bücher-Einheiten, wurde auch hier als positive Virusinfektion angesehen. Nähere Angaben über Anzahl der Versuchstiere, die Dauer der Versuche oder die Impfdosis werden, falls sie abweichend von der hier aufgeführten Methodik sind, bei den einzelnen Kapiteln angeführt.

Bestimmung der Infektiosität des LDH-Virus:

Mit LDH-Virus-haltigen Tumor- und Organextrakten wurden in Hanks'scher Lösung einfache geometrische Verdünnungsreihen hergestellt. Die einzelnen Verdünnungen wurden wie oben im Tierversuch auf ihren Gehalt an LDH-Virus untersucht.

Blutentnahme zur Fermentbestimmung:

Durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Glaskapillaren (RILEY, 46) wurden der Maus 0,25 ml Blut abgenommen. Die Kapillaren wurden bei 2000 U/mir zentrifugiert und man erhielt etwa 0,05 ml Serum. Bis zur Fermentbestimmung wurden die Kapillaren bei +4 Grad C aufbewahrt; die Aufbewahrung ist ohne Aktivitätsabfall über 48 h möglich.

Messung der Serum-LDH:

Das Ferment LDH wurde im optischen Test nach Warburg im Eppendorf-Photometer bei 366 m μ gemessen. Als Reagentien wurden die Puffer-Pyruvat-Substrate und DPNH der Fa. Boehringer u. Söhne, Mannheim, verwendet. Die Reaktion wurde eine Minute lang automatisch registriert, die Fermentaktivität in Einheiten nach Bücher berechnet.

Tiergut:

Es wurden weiße Mäuse des Stammes NMRI der Gesellschaft für Versuchstierzucht Hannover und weiße Mäuse aus der Süddeutschen Versuchstierfarm in Tuttlingen verwendet. Die Tiere wurden nach Versuchsgruppen getrennt in Kunststoffkäfigen gehalten und mit Pressfutter "Murilan" ernährt. Die Käfige wurden regelmäßig desinfiziert, die Futternäpfe und Saugflaschen autoklaviert.

C. IMPFGESCHWÜLSTE

LDH-Virus aus dem Mäuseimpftumor Landschütz-Sarkom Sa.I

In früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß im Landschütz-Sarkom Sa I ein Lactatdehydrogenase-erhöhendes Virus (LDH-Virus) enthalten ist (GEORGII, 14; GEORGII et al., 15, 16, 17).

Das LDH-Virus wurde zunächst in der Ascitesflüssigkeit dieses Transplantationstumors gefunden. Damals waren einige Fragen über Eigenschaften dieses Virus offen geblieben. So zum Beispiel die Frage seiner Vermehrung auf der Maus, die Aktivität des Virus, gemessen an seiner LDH-erhöhenden Eigenschaft in Verdünnungsreihen und schließlich blieb zu klären, ob es sich hier um eine gleichartige Wirkung des Virus bei Mäusen unterschiedlicher Abkunft handelte. CRISPENS (8) hatte nämlich in einigen Versuchen eine Abhängigkeit des LDH-Spiegels vom Stamm der Tiere festgestellt. Zur Klärung dieser Fragen wurden 4 verschiedene Experimente angestellt.

- 1) Vorkommen und die Verteilung des LDH-Virus wurde im soliden Impftumor und im Organextrakt eines Tumortieres untersucht.
- 2) Der Infektionstitel wurde in fortlaufenden Verdünnungsfreihen der aus dem Tumor

gewonnenen Stammlösung des Virus geprüft.

- 3) Zur Sicherung der Reproduktion des Virus bzw. seiner Vermehrung im tierischen Organismus war es notwendig, zellfreie Übertragungspassagen von tumorfiltratbeimpften Mäusen durchzuführen. Bei der Schilderung unserer Ergebnisse sind jeweilige Abweichungen von der anfangs dargestellten Methodik der Übertragung oder des Virusnachweises angegeben.
- 4) Es wurden Swiss-Mäuse verschiedener Tierzuchtanstalten verwendet, um genetische Einflüsse zweier verschiedener Mäuselinien auszuschließen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1) Verteilung des LDH-Virus in den Tumormäusen

Im ersten Experiment wurde das in der Ascitesform des Mäusesarkom I nachgewiesenen LDH-Virus auch im soliden Geschwulstgewebe und in den Organen der Tumormäuse nachgewiesen. Vor allem wurde die Milz zur Gewinnung eines zellfreien Extraktes mit LDH-Virus benützt. Es fand sich der übliche Anstieg der LDH und die genauen Einzelwerte hierzu sind in der Tabelle 1 dargestellt. Die Tabelle enthält im Vergleich den Fermentverlauf nach Virusgabe aus solidem Landschütz-Sarkom. Die Wirkungen sind im wesentlichen gleich.

Bei Mäusen mit Landschütz-Sarkom ist also das LDH-Virus in der Tumoraufschwemmung des Ascites, im soliden Tumorgewebe und in der Milz infizierter Tiere grundsätzlich gleichartig enthalten. Weiter wurde das Virus auch im Serum infizierter Tiere sowie in den Organen Leber und Niere nachgewiesen, woraus sich eine praktisch ubiquitäre Ausbreitung des LDH-Virus im Organismus des infizierten Tieres ergibt; dieser Befund entspricht den Feststellungen von RILEY et al, besonders mit LDH-Virus aus Melanom 91, CLOUDMAN und anderen Transplantationstumoren (49).

TABELLE 1

	4 Tage p. inf.		6 Tage p. inf.		12 Tage p. inf.	
	Grenzwerte	Mittelwert	Grenzwerte	Mittelwert	Grenzwerte	Mittelwert
Tumor 1:	115-120	118,3	155-220	178	150-251	179
Tumor 2:	85-130	113	185-250	218	220-490	302
Tumor 3:	100-180	135	95-235	170	150-340	226
Tumor 4:	198-292	255	210-240	222	140-190	170
Tumor 5:	193-275	236	114-190	146	160-220	200
Tumor 6:	200-240	223	175-190	182	215-240	228
Organe aus Tumor- tieren:	100-180	145	155-180	167	175-237	204

Tabelle 1: Das Serumferment LDH bei Mäusen nach Infektion mit dem LDH-Virus aus 6 verschiedenen soliden Landschutz-Sarkomen und aus Organen dieser Tiere. Die Zahlen sind Bücher-Einheiten für die Fermentaktivität; sie wurden an 3 verschiedenen Tagen (4., 6. und 12.) nach der Infektion gemessen.

2) Bestimmung des Infektionstiters

In einem zweiten Experiment wurde der Virustiter im Ascites des Landschütz-Sarkoms geprüft. Dazu wurde das üblicherweise gewonnene Tumorfiltrat durch Hanks'sche Lösung in einer geometrischen Verdünnungsreihe aufgeteilt und diese Verdünnungschargen Gruppen von Empfängermäusen zu 5 Tieren intraperitoneal injiziert.

Der Verlauf der Serum-LDH wurde vom 4. Tage nach der Infektion an über einen Zeitraum bis zu 43 Tagen fortlaufend kontrolliert. Dazu ist anzumerken, daß lediglich diejenigen Fermentwerte, die unmittelbar nach der Infektion, d. h. in einem Zeitraum von 4 bis maximal 7 Tagen, einer deutlichen 5-fachen Serumfermenterhöhung entsprachen, als positive Infektion gewertet wurden. So beobachteten wir in einigen Fällen, daß die nächsthöhere Verdünnungscharge zunächst negativ war und 20 Tage später die Empfängertiere eine Erhöhung ihrer Serum-LDH zeigten. Dies wurde nicht mehr als positive Wirkung des LDH-Agens und damit seiner Infektiosität gewertet, da dieser positive LDH-Effekt durch Kontakt- oder Schmierinfektion zustande gekommen sein konnte (GRISPENS, 9; NOTKINS u. SCHEELE, 38).

Wir untersuchten 3 verschiedene Proben eines zu verschiedenen Zeiten und aus verschiedenen Transplantationspassagen stammenden Tumors. Dabei stellten wir fest, daß die eine Tumorphobe (A) einen infektiösen Titer von 10^3 , während eine andere Tumorphobe (B) einen Titer von 2×10^3 hatte. Schließlich wurde in einer 3. Probe (Filtrat C) ein Titer von $1,6 \times 10^4$ festgestellt. Diese Ergebnisse bedeuten, daß in dem zu unterschiedlichen Zeiten und aus unterschiedlichen Tumortransplantaten stammenden Material ein unterschiedlicher Gehalt an infektiösem Material, d. h. an Virusaktivität nachgewiesen wurde.

Für diese unterschiedliche Infektiosität gibt es mehrere Erklärungen. Zunächst ist zu berücksichtigen, daß wir die verschiedenen Tumorproben zu unterschiedlichen Zeiten nach seiner Transplantation gewonnen haben. Somit könnte also die Wachstumsintensität, d. h. die Vermehrung der im Ascitestumor schwimmenden Zellen den Gehalt des Tumors an LDH-Virus beeinflussen. Andererseits ist aber zu bedenken, daß der Tumor auf den einzelnen Wirtstieren unterschiedlich wächst. Es handelt sich eben um Virusmaterial aus verschiedenen Transplantationspassagen. Das würde bedeuten, daß Beziehungen zwischen dem LDH-Virus und den transplantierten Tumorzellen sowie auch zu dem Zellsystem des neuen Wirtstieres für die Virusvermehrung entscheidend sind.

Schließlich ist als letzte Überlegung anzuführen, daß unbekannte biologische Faktoren im Moment der Virusgewinnung bzw. seines Nachweises durch die LDH-Erhöhung mitspielen und von uns nicht erfaßt werden können. Sie vermögen eine Titterschwankung von 1-2 Zehnerpotenzen zu erklären.

3) Vermehrung des LDH-Virus in fortlaufenden Übertragungen

Durch zellfreie Übertragung in fortlaufenden Passagen auf Tuttlinger Mäusen wurde die Reproduktion des Virus bzw. seine Vermehrung im tierischen Organismus untersucht. Ähnliche Experimente waren bereits von GEORGII et al., 15; MUNDY u. WILLIAMS, 33 und RILEY et al., 50 durchgeführt worden.

Weil unklar war, welche zeitlichen Abstände für die Übertragung des LDH-Virus am günstigsten sind, wurde das LDH-Virus zunächst im 2-tägigen Intervall übertragen. Bei dieser Übertragungsform, wobei also jeweils 2 Tage nach der Beimpfung die nächste Mäusepassage vorgenommen wurde, erfolgte bei der 7. Passage eine weit geringere Serumfermenterhöhung als in den vorhergegangenen. In der darauffolgenden 8. und 9. Tierpassage waren die LDH-Werte nach Virusbeimpfung normal (Tabelle 2).

Mit dem Restmaterial aus der 6. Passage der 2-tägigen Übertragungsform wurden neue Übertragungsversuche nunmehr im 4-tägigen Abstand durchgeführt. Dabei zeigte sich im Gegensatz zu vorher, daß bei diesem Übertragungsintervall die bekannte Viruswirkung mit der Fermentwirkung bis zur 10. Passage auftrat.

TABELLE 2

Zahl der Virus-Passagen	2-tägige Virus-Passage		4-tägige Virus-Passage	
	Grenzwerte	Mittelwert	Grenzwerte	Mittelwert
1	16-200	82		
2	100-140	120		
3	95-260	153,5		
4	105-170	121,8		
5	122-156	137,3		
6	165-360	193,8		
7	85-140	106,3	150-300	251,6
8	30- 92	60,8	123-180	151,6
9	50- 85	66,5	80-230	121
10			110-205	152

Tabelle 2: Beobachtung der S-LDH bei 2 verschiedenen Passage-Zyklen des LDH-Virus auf Mäusen über 10 Passagen (s. a. Tabelle 3).

LDH-Virus aus Landschütz-Sarkom; Zahlen sind Bü.E. der LDH-Aktivität. Virusübertragung durch zellfreie Seitz-Filtrate des Organextraktes aus Leber.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das 2-tägige Übertragungsintervall für die Vermehrung des LDH-Virus zu kurz ist und deshalb ein Verdünnungseffekt auftritt. Um nun das günstigste Übertragungsintervall für die Vermehrung des LDH-Virus zu finden, wurden Organpassagen in 2-4- und 6-tägigem Abstand durchgeführt.

Beim 4- und 6-tägigen Übertragungsabstand blieb die Viruswirkung auf die Serum-LDH immer positiv. Dagegen blieb bei der 2-tägigen Übertragungsform bei 2 Tierpassagen der 5. und 11., die Serum-LDH unverändert (Tabelle 3). Trotzdem zeigten die jeweils darauffolgenden Virusübertragungen wieder den gewohnten Effekt auf die Serum-LDH. Bei Versuchsabbruch nach der 16. Passage war in allen 3 Übertragungsperioden ein für die Serum-LDH der Empfängertiere gleicher Effekt nachweisbar. Eine solche praktisch unbegrenzte Möglichkeit, das Virus in Tier-

passagen zu übertragen, fanden auch RILEY et al., 47.

Die Übertragbarkeit des Virus bis zur 16. Passage bedeutet, daß das Virus sich sicher vermehrte, wobei besonders der 4- und 6-tägige Passage-Zyklus günstig zu sein scheint. Bei der 2-tägigen Passage dagegen trat vorübergehend eine Abschwächung der Viruswirkung auf, die aber reversibel war.

TABELLE 3

Zahl der Virus- Passagen	2-tägige	4-tägige Virus-Passage	6-tägige
1	148,8	178,4	97
2	116,2	257,2	135
3	119,6	155,3	148
4	105,4	207,6	154,6
5	80	155	128,5
6	99	177,6	186,4
7	118	200	179,1
8	118,3	191,6	302,5
9	143,3	188,3	231,6
10	133,8	218	167,8
11	67,6	241,6	220
12	109,4	218,6	130
13	121,2	263,3	227,5
14	161	192,5	175,8
15	194	244	205,8
16	193	175	183

Tabelle 3: Beobachtung der Mittelwerte der S-LDH bei 3 verschiedenen Passage-Zyklen des LDH-Virus auf Mäusen über 16 Passagen. Virus und Übertragung wie in Tabelle 2.

Bei diesen Untersuchungen fiel uns auf, daß das Virus durch wiederholtes Einfrieren bei -24 Grad und Auftauen offenbar geschädigt wurde und dabei seine Wirkung auf den LDH-Spiegel verlor (GEORGII, 13). Der zweimalige Abfall des LDH-Spiegels bei der 2-tägigen Übertragungsform könnte für eine Schädigung des Virus durch derartige technische Fehler bei der Herstellung der Organextrakte sprechen.

Für Aussagen über das Verhalten von LDH-Virus während der Wirtstierpassagen ist sein infektiöser Titer von Bedeutung. Wir versuchten deshalb, bei einigen Passagen der oben geschilderten Versuche den Infektionstiter festzulegen.

Dazu wurden sowohl die Infektiosität des Ausgangsmaterials (Landschütz-Sarkom) als auch der zellfreien Organextrakte von Mäusen aus der 16. Passage aller 3 Übertragungsformen in geometrischen Verdünnungsreihen gemessen. Wie die Tabelle 4 zeigt, war der infektiöse Titer des Ausgangsmaterials des Tumorgewebes von Landschütz-Sarkom 8×10^3 . Dagegen war bei der 16. Passage der 2- und 4-tägigen Übertragungsform der Infektionstiter übereinstimmend auf 2×10^4 erhöht. Die Infektiosität des Organfiltrates aus der 16. Passage der 6-tägigen Übertragungsform betrug zur gleichen Zeit 8×10^4 .

TABELLE 4

Virusverdünnungen des Ausgangsvirus	2×10^3	4×10^3	8×10^3	$1,6 \times 10^4$		
	pos.	pos.	pos.	neg.		
Virusverdünnungen 2-tägige Virus- Passage	5×10^3	1×10^4	2×10^4	4×10^4	8×10^4	$1,6 \times 10^5$
	pos.	pos.	pos.	(pos.)	neg.	-
4-tägige Virus- Passage	pos.	pos.	pos.	(pos.)	neg.	neg.
6-tägige Virus- Passage	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.

Tabelle 4: Änderungen des Infektionstiters nach der 16. Passage des Virus auf Mäusen bei einer 2-, 4- und 6-tägigen Übertragungsform im Vergleich zur Infektiosität des Ausgangsvirus. LDH-Virus aus Landschütz-Sarkom Sa I; Virusnachweis durch bleibenden Anstieg der Serum-LDH auf über 100 Bü.E. für mehr als 2 Wochen. Virusübertragung in den 16 fortlaufenden Passagen durch zellfreie Seitzfiltrate des Organextraktes aus Leber.

Die Ergebnisse bedeuten, daß sich das Virus während der 6-tägigen Übertragungsform am günstigsten vermehrte, wofür seine größte Titerhöhe spricht. Dazu ist zu sagen, daß bei so relativ geringen Titterschwankungen von 8×10^3 bis 8×10^4 eine stärkere Vermehrung des Virus nicht unbedingt als bewiesen gelten kann, wie bereits im Abschnitt 2) erwähnt wurde.

4) Wirkung von LDH-Virus bei 2 verschiedenen Mäuselinien

Um eventuelle Abweichungen des LDH-Spiegels im Serum von Mäusen verschiedener Herkunft (CRISPENS, 8) nach Infektion mit dem LDH-Virus zu erfassen, wurden jeweils 5 Mäuse des Stammes NMRI von der Gesellschaft für Versuchstierzucht Hannover und 5 Mäuse aus der Süddeutschen Versuchstierfarm Tuttlingen mit dem LDH-Virus aus dem Landschütz-Sarkom infiziert. Die Serum-LDH wurde bei beiden Tiergruppen über einen Zeitraum von 43 Tagen wiederholt gemessen.

Es kam bei beiden Tiergruppen am 4. Tage nach der Infektion zum typischen Anstieg der LDH. Der Fermentspiegel blieb bis zum Abbruch des Versuches bei beiden Tierstämmen erhöht (Tabelle 5). Bis auf geringe Schwankungen der LDH-Werte, besonders am 13. Tage, war der Fermentspiegel bei beiden Tierstämmen gleich hoch. Das bedeutet, daß genetisch unterschiedliche Mäuse nach einer Infektion mit dem LDH-Virus mit dem gleichen Anstieg der Serum-LDH reagieren.

TABELLE 5

LDH im Serum der Tiere	Tuttlinger Mäuse		NMRI-Mäuse	
	Grenzwerte	Mittelwert	Grenzwerte	Mittelwert
vor der Infektion	12- 25	20,4	19- 45	34
4 Tage nach Infektion	160-370	242	210-360	260
9 " " "	210-390	272	210-360	293,3
13 " " "	220-550	330	240-330	285
30 " " "	172-275	223,5	175-250	201,6
34 " " "	185-240	212,5	155-250	200

Tabelle 5: Die Wirkung von LDH-Virus bei 2 verschiedenen Mäuselinien, Swiss-Mäusen aus Tuttlingen und Swiss-NMRI-Mäusen aus Hannover; Beobachtung der Serum-LDH über 34 Tage nach der Virusinfektion.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Instituts-eigenen Transplantationstumor Landschütz-Sarkom wurde ein LDH-Virus gefunden, welches im Ascitestumor, in der soliden Form des Tumors und in den Organen der Tumortiere vorkommt. Dieses Virus ließ sich beliebig lang über Tierpassagen in verschiedenen Übertragungsabständen zellfrei übertragen. Die

4- und 6-tägige Übertragungsform wurde als die günstigste für die Virusvermehrung festgestellt. Bei der 2-tägigen Übertragungsform ließ die Wirkung des Virus auf den Fermentspiegel bei einigen Passagen vorübergehend nach, vermutlich bedingt durch technische Fehler bei der Herstellung der Organextrakte. Die Infektiosität des Virus schwankte zwischen einem Titer von 10^3 und $1,6 \times 10^4$, möglicherweise durch einen unterschiedlichen Zellgehalt der Ascitestumoren bedingt. Auf Swiss-Mäuse unterschiedlicher Herkunft wird das LDH-Virus gleichartig.

LDH-VIRUS AUS DEM EHRLICHSCHEN MÄUSEASCITESTUMOR (EAT)

Wir untersuchten, ob der Ehrlichsche Mäuseascitestumor von Lettrè-Weber (EAT), der seit Jahren am Pathologischen Institut gehalten wird, das LDH-Virus enthält. Neben dem qualitativen Virusnachweis wurde seine Vermehrung auf der Maus in fortlaufenden Übertragungen untersucht. Als Ausgangsmaterial für die Durchführung der Virusübertragung wurden solide Impfgeschwülste verwendet. Die Angaben über die Züchtung der soliden Geschwülste und über die Virusgewinnung sind im Abschnitt Material und Methodik festgelegt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1) Wirkung des LDH-Virus auf die Fermenthöhe

Im ersten Experiment verursachte die Übertragung von EAT im Serum der Empfängertiere während der Beobachtungszeit von 58 Tagen eine dauernde Erhöhung der LDH (Tabelle 6). Es bestanden zwar beträchtliche Unterschiede in der Höhe der Fermentverschiebungen, doch genügten die Erhöhungen in jedem Falle für den Virusnachweis, wie die Tabelle 6 zeigt. Damit wurde auch im Ehrlichschen Ascitestumor ein LDH-Virus nachgewiesen, was mit den Ergebnissen von BAYERLE et al. (2) übereinstimmt.

TABELLE 6

Tage nach der Beimpfung	Grenzwerte	Mittelwert
4	250-400	310
8	130-345	220,8
15	140-230	185
23	240-440	342
30	250-380	304
42	180-225	206,5
46	175-220	192,5
52	215-275	240
58	240-310	272

Tabelle 6: Das Ferment Lactatdehydrogenase im Serum nach Infektion normaler Swiss-Mäuse mit zellfreien Filtraten aus Ehrlich-schem Ascitestumor.

2) Vermehrung des LDH-Virus in fortlaufenden Übertragungen

In einem zweiten Experiment wurde die Vermehrung des LDH-Virus aus EAT in fortlaufenden Übertragungen auf Mäusen untersucht. Der Abstand der Übertragungszeit betrug 4 Tage. Ausgangsmaterial für die Virusisolierung waren solide Impfgeschwülste des EAT.

Wie bei den vorausgegangenen Untersuchungen mit dem Landschütz-Sarkom fanden wir auch hier im Serum der Wirtstiere einen dem Tumorwachstum entsprechenden Anstieg der LDH. Die Fermenterhöhung der Tumortiere war bedeutend stärker als sie nach zellfreier Übertragung des LDH-Virus im Serum von Empfängertieren auftrat.

Das zellfreie Filtrat aus diesen soliden Tumoren verursachte eine deutliche LDH-Erhöhung im Serum von Empfängertieren. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, daß der Ehrlichsche Mäusetumor in solider Form ebenso wie in Ascitesform ein LDH-Virus enthält.

Auch nach Übertragung von zellfreien Organhomogenaten auf neue Empfängertiere war das LDH-Virus durch seine fermenterhöhende Wirkung nachweisbar. Der Virusnachweis konnte bei zellfreien Organübertragungen über 5 Passagen ge-

führt werden. Bei der 6. Passage fehlte der LDH-Effekt (Tabelle 7), weshalb der Versuch beendet wurde.

Es ist ungeklärt, ob hier ein Verdünnungseffekt oder, was wir vermuten, eine durch äußere Umstände verursachte Schädigung des Virus erfolgte.

TABELLE 7

Zahl der Virus-Passagen	LDH im Serum der Empfängertiere	
	Grenzwerte	Mittelwert
1	175-280	214,2
2	110-250	198
3	130-220	170
4	105-110	109
5	150-270	223,3
6	30-100	68,8

Tabelle 7: Übertragung des LDH-Virus in 4-tägigem Passage-Zyklus auf Mäusen über 6 Passagen. Das LDH-Virus wurde aus Ehrlichschem Ascitestumor gewonnen.

Bei der Diskussion ähnlicher Ergebnisse mit dem LDH-Virus aus dem Mäuse-Sarkom I wurde besonders auf die Kälteempfindlichkeit des Virus hingewiesen, die inzwischen durch Untersuchungen von Prechtel (Dissertation München 1965) nachgewiesen wurde. Die über 5 Passagen durchgeführte Virusübertragung macht wahrscheinlich, daß auch bei 4-tägigen Übertragungs-Zyklen eine Vermehrung des LDH-Virus erfolgt; diese Eigenschaft unterstreicht die Virusnatur unseres Agens. Außerdem bedeutet die gelungene Übertragung des LDH-Virus durch Passagen aus Leber seine Anwesenheit im Organgewebe ebenso wie im Tumor (GEORGII et al., 15; RILEY et al., 47, 49).

Weitere Versuche, das LDH-Virus durch fortlaufende Passagen zu übertragen und damit seine Vermehrung in vivo zu beweisen, wurden mit dem LDH-Virus aus dem Mäusesarkom I (Landschütz) im vorhergegangenen Abschnitt gebracht.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Instituts-eigenen Ehrlichschen Mäuseascitestumor wurde ein LDH-Virus nachgewiesen, welches im Ascitestumor, im soliden Tumorgewebe und in den Organen der Tumortiere enthalten ist. Dieses LDH-Virus ließ sich über 5 Tierpas-

sagen zellfrei übertragen und ging dann aus nicht ganz geklärten Gründen verloren, wobei wir in erster Linie an eine Virusinaktivierung durch die Kältekonservierung denken.

D) NACHWEISVERSUCHE VON LDH-VIRUS IN SPONTANEN MÄUSEGESCHWÜLSTEN

Nachdem wir im Mäusesarkom I (Landschütz) und im Ehrlichschen Ascitestumor ein Agens gefunden hatten, dessen Nachweis in einer fortlaufenden Erhöhung der Serum-LDH besteht, versuchten wir ein ähnliches Virus in spontan entstandenen Mäusegeschwülsten zu finden.

Zunächst wurde der einfache Versuch des Virusnachweises unternommen, wozu die in den vorhergegangenen Abschnitten angewandte Übertragung diente. In einem weiteren Experiment wurde durch fortlaufende Mäusepassagen versucht, ein latentes Virus zu aktivieren (HAAGEN, 20; KIKUTH u. GÖNNERT, 26; MEYER, 30; MEYER u. EDDI, 31).

Dem lag der Gedanke zugrunde, daß ein Agens ohne LDH-erhöhende Komponente vorliegen könnte, welches durch fortlaufende Mäusepassagen aktiviert wurde. Unter Aktivität des Virus verstehen wir in unseren Versuchen die typische Wirkung auf den LDH-Spiegel im Serum normaler Empfängermäuse.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1) Nachweisversuche von LDH-Virus in Tumormäusen

In einem ersten Experiment versuchten wir, in 24 Tumormäusen des NMRI-Stammes und 4 Tumormäusen des C3H-Stammes ein LDH-Virus nachzuweisen. Dazu wurden zellhaltige und zellfreie Tumorextrakte sowie Organextrakte dieser Tumortiere auf normale Empfängermäuse übertragen. In einigen Fällen wurde auch das Blutserum von Tumormäusen auf Empfängermäuse übertragen.

Die Beobachtung des LDH-Spiegels im Serum der Empfängertiere erfolgte in üblicher Weise bis zu einem Zeitraum von 75 Tagen.

TABELLE 8

Tumormäuse	LDH der		Serum-LDH bei Empfängermäusen über 75 Tage															
	Spender.	4	6	8	11	15	21	27	32	34	44	50	61	67	75			
1 Mamma-Ca.	25	31													18			
2 Parotis-Ca.	30	17									28,5				26			
3 Mamma-Ca.	13	17									17,5				9			
4 Mamma-Ca.	18	15									45							
5 Mamma-Ca.	95	-									15,5				18			
6 Mamma-Ca.	36		14															
7 Parotis-Ca.	116	20		11,5	25			24,5	30			11,5	17	14				
8 Mamma-Ca.	50	28		30				21	17			18	23	21				
9 Mamma-Ca.	28	35		17	35			15	12			12	21	14				
10 Mamma-Ca.	32	22		11,5	22			18	20			10	17	10				
11 Mamma-Ca.	83	15												30	22			
12 Mamma-Ca.	84	22												18	18			
13 Mamma-Ca.	24	19	30		28	33	42	41										
14 Mamma-Ca.	47	19	25		26	36	36	42,5										
15 Mamma-Ca.	26		18															
16 Mamma-Ca.	45	26											24,5		21			
17 Mamma-Ca.	176	18											26		36			
18 Mamma-Ca.	-	19	25		22	24	22						30		14,5			
19 Mamma-Ca.	-	16	27		39	33	36	46	42,5									
20 Mamma-Ca.	-	15	17		45	17	27	35,5										

Tabelle 8: Die Serum-LDH von Tumormäusen und von Empfängermäusen des zellfreien Filtrates der Spontanumoren.

Von den 28 Tumortieren zeigten 3 Tiere einen mäßig erhöhten, 2 weitere einen stärker erhöhten LDH-Gehalt. Geschwulstfiltrate der Tiere mit erhöhter S-LDH verursachten ebenso wenig einen LDH-Effekt bei Empfängertieren wie die übrigen Tumormäuse (Tabellen 8 - 10). Lediglich bei einigen Empfänger-mäusen wurden leicht erhöhte LDH-Werte gefunden (Tabelle 10). Solche geringfügigen LDH-Erhöhungen fanden wir schließlich auch bei unbehandelten Mäusen. LDH-Werte von über 100 Büchereinheiten, die wir erst als Beweis für die Anwesenheit des Virus gelten ließen, traten bei diesen Empfängermäusen nie auf.

TABELLE 9

Beobachtungstage	4	11	14	19	24	29	34
21 <u>Mamma-Carcinom</u>							
a) Tumor-Suspension	43		35				59
Zellfreier Extrakt	22		30		27		45
22 <u>Mamma-Carcinom</u>							
a) Tumor-Suspension	16	15			21		
Zellfreier Extrakt	18	10			23		
b) Organ-Suspension	11	11			35		
Zellfreier Extrakt	9	9			7		
23 <u>Mamma-Carcinom</u>							
a) Zellfreier Tumor-Extrakt	53	23		18		34	
b) Zellfreier Organ-Extrakt	40	25		10		27	
24 <u>Mamma-Carcinom</u>							
a) Zellfreier Tumor-Extrakt	49	18		23		39	
b) Serum des Tumortieres	29	29		18		23	

Tabelle 9: Die Wirkung verschiedener Tumor- bzw. Organextrakte spontantumortragender NMRI-Mäuse auf die Serum-LDH normaler Swiss-NMRI-Mäuse.

TABELLE 10

Beobachtungstage	4	7	12	17	22	27
1) Mamma-Ca. zellfreier Tumor- Extrakt	37	41	49		47	30
Serum des Tumor- tieres	63	49	58		37	26
2) Mamma-Ca. zellfreier Tumor- Extrakt	51	61				
Serum des Tumor- tieres	48	34	50		32	25
3) Mamma-Ca. zellfreier Tumor- Extrakt	32	17	38	39	51	30
4) Mamma-Ca. zellfreier Tumor- Extrakt	23	21	40	36	51	27

Tabelle 10: Die Wirkung von zellfreiem Tumorextrakt bzw. Serum von Inzucht-Mäusen des C3H-Stammes mit spontanen Tumoren auf die Serum-LDH von normalen Swiss-Mäusen.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf 28 verschiedene Tumormäuse und schlossen den versuchten Virusnachweis in 3 verschiedenen Gewebsanteilen der Spendermäuse mit ein. Es wurde also in keinem der 28 Tumormäuse ein LDH-Virus gefunden, wie es in Impfgeschwülsten regelmäßig und ohne Schwierigkeiten nachgewiesen werden konnte. Es handelte sich demnach bei der LDH-Erhöhung einzelner Tumorstiere nicht um eine Infektion mit dem LDH-Virus, sondern der LDH-Effekt dürfte durch Fermentfreisetzung aus nekrotischen Tumorzellen verursacht sein.

2) Aktivierungsversuche eines latent vermuteten LDH-Virus

Es ist bekannt, daß Viren im Organismus latent sein können (HAAGEN, 20; KIKUTH u. GÖNNERT, 26; MEYER, 30; MEYER u. EDDI, 31), weil sie zu wenig virulent oder in zu geringer Menge vorhanden sind, um Veränderungen auszulösen. Eine Virulenzsteigerung oder Vermehrung in vivo kann durch Passagen auf Tieren erreicht und damit die gesuchten Veränderungen propagiert werden. In unseren Versuchen ist die Wirkung des LDH-Virus auf den Fermentspiegel von Empfängermäusen die gesuchte Viruswirkung.

Deshalb versuchten wir, das vermutete latente LDH-Virus der Spontantumoren durch fortlaufende zellfreie Übertragungen zu aktivieren. Zu diesem Zweck wurde ein zellfreier Tumorextrakt den Empfängermäusen injiziert und von diesen zellfreie Organauszüge aus Leber und Milz auf neue Empfängertiere übertragen. Diese Organübertragungen wurden in 10 fortlaufenden Passagen durchgeführt. Einmal, bei der 9. Passage, trat eine vorübergehende Erhöhung der LDH auf, die sich bei der nächsten Übertragung wieder verlor (Tabelle 11). Diese vorübergehende Erhöhung der LDH durfte nicht als Virusnachweis gewertet werden, da in der folgenden Passage keine Beeinflussung des Fermentspiegels auftrat. Nach unseren Erfahrungen ist anzunehmen, daß parenchymatöse zelluläre Störungen in dieser Tierpassage, möglicherweise durch bakterielle Infektion, für die vorübergehende Fermentverschiebung verantwortlich waren.

TABELLE 11

Zahl der Blind-Passagen	Grenzwerte	Mittelwert
1	17- 46	33
2	26- 48	33,3
3	19- 20	19,3
4	12- 35	20,3
5	28- 72	43,3
6	18- 53	33,6
7	18- 54	40,6
8	30- 55	42,8
9	106-130	115,4
10	20- 85	50,6

Tabelle 11: Aktivierungsversuch eines latent vermuteten Virus in einem Spontantumor durch fortlaufende Übertragung von Organewebe auf neue Empfängertiere in 4-tägigem Abstand über 10 Passagen. Ausgangsmaterial war ein spontanes Mammarcarcinom einer Swiss-NMRI-Maus.

Aus den Reihenuntersuchungen von insgesamt 28 Spontangeschwülsten der Maus und dem Aktivierungsversuch durch Tierpassagen ergab sich, daß spontane Mäusegeschwülste grundsätzlich frei von Rileyschem Agens sind.

Diese Untersuchungen stimmen überein mit den Ergebnissen von ADAMS et al. (1), GEORGII et al. (15), MUNDY u. WILLIAMS (33), RILEY (50) fand dagegen in einigen spontan entstandenen Mammacarcinomen der Maus das LDH-Agens. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten wegen der Übertragbarkeit des Virus durch Speichel, Kot und Urin (CRISPENS, 9; NOTKINS u. SCHEELE, 38) mit einer Schmier- oder Kontaktinfektion erklärt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung von 28 Spontangeschwülsten der Maus (Mamma- und Parotiscarcinomen) ergab, daß keines dieser Tiere, auch nicht in einer latenten Vorstufe, ein LDH-erhöhendes Riley-Virus enthält. Der nachgewiesene LDH-Effekt verschiedener Tumortiere muß mit regressiven Veränderungen im Geschwulstgewebe in Zusammenhang gebracht werden.

E) DIE WIRKUNG VON LDH-VIRUS BEI MÄUSEN MIT SPONTANTUMOREN

Wenn virusfreie Mäuse mit spontanen oder carcinogen induzierten Geschwülsten durch LDH-Virus infiziert werden, tritt eine entscheidend stärkere Fermenterhöhung als bei normalen Mäusen auf, die mit gleichen LDH-Virus infiziert wurden (GEORGII, 13; NOTKINS u. GREENFIELD, 35; RAUEN u. HUPE, 41; RILEY, 42, 43; RILEY et al., 49, ROWSON et al., 53).

Diese Verstärkung des LDH-Effektes bei Tumormäusen wurde von RILEY (42) als synergistischer Effekt oder einfach als Synergismus bezeichnet, hervorgerufen durch die Wirkung des LDH-Virus auf Wachstum und Glykolyse von agensfreien Geschwülsten sowie durch die Tumorrückwirkung auf den Fermenteffekt (RILEY, 42; RILEY, 43; RILEY et al., 48, RILEY et al., 49). Der synergistische Effekt wurde dagegen bei den anderen glykolytischen Fermenten nicht beobachtet (PLAGEMANN et al., 39; PLAGEMANN u. SWIM, 40).

Einen solchen synergistischen Effekt versuchten wir bei Mäusen mit spontanen Mammacarcinomen auszulösen. Außerdem versuchten wir zu klären, ob normale Mäuse nach Infektion mit dem LDH-Virus eine stärkere Fermenterhöhung zeigten, wenn ihnen gleichzeitig zellfreier Extrakt aus den von uns als virusfrei gefundenen Spontangeschwülsten injiziert wurde.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1) Synergistischer Effekt zwischen LDH-Virus und Tumorgewebe

8 virusfreie tumortragende Mäuse wurden mit dem LDH-Virus aus dem Transplantationstumor Sa I (Landschütz) infiziert. Mit demselben virushaltigen Tumorextrakt aus Ascitestumor Sa I wurden 8 normale Mäuse infiziert. Um einen unspezifischen Effekt durch organische Gewebekomponenten auszuschließen, wurde in einer Kontrollserie Tumormäusen Organextrakt von normalen Mäusen injiziert. Die Fermentwerte von LDH wurden jeden 2. Tag bis zum 15. Tage des Versuches gemessen. Danach zeigte sich, daß die mit dem LDH-Virus beimpften tumortragenden Mäuse einen höheren Anstieg an LDH hatten als die infizierten Kontrolltiere. Besonders traten Unterschiede der Fermenthöhe am 2. und 4. Versuchstage auf. Dabei war bemerkenswert, daß die Tumormäuse mit den höchsten LDH-Werten kurz darauf verendeten (Tabelle 12). Betrachtete man die einzelnen Tiere unserer Versuchsgruppe, so zeigte sich bei jedem Tier mit besonders hohen Werten von über 400 Büchereinheiten, daß sie kurze Zeit später spontan verendeten. Dagegen überlebten Tiere mit Fermentwerten zwischen 180 und 300 Büchereinheiten, d. h. mit 8 - 10-fachen Normwerten die Versuchszeit gut. Aus dem Vergleich der Mittelwerte dieser Versuchsgruppe wurde deutlich, daß der höhere LDH-Wert von Tumormäusen im wesentlichen durch diese einzelnen Tiere mit besonders hohen LDH-Werten bedingt war.

TABELLE 12

	Virus-infizierte Tumormäuse		Virus-infizierte Kontrollmäuse	
	Grenzwerte	Mittelwert	Grenzwerte	Mittelwert
vor Infektion	29-108	62	20- 48	27
nach Infektion				
2	180-530	273	100-235	133
4	175-920	394	115-200	174
6	225-435	313	140-340	216
8	165-530	349	180-370	253
10	160-470	302	100-300	197
13	200-360	257	135-225	175
15	180-530	305	150-260	202

Tabelle 12: Die Wirkung von LDH-Virus bei Swiss-NMRI-Mäusen mit spontanen Mammacarcinomen und bei tumorfreien Swiss-NMRI-Mäusen über die Beobachtungszeit von 15 Tagen.

So ist zu verstehen, daß insgesamt ein höherer durchschnittlicher LDH-Spiegel bei virusbeimpften Tumortieren als bei virusbeimpften Kontrollmäusen vorlag.

Das besondere Ergebnis unseres Versuches ist demnach, daß nur einzelne Tumormäuse mit dem von RILEY (41) sogenannten Virus-Tumor-Synergismus reagierten. Es war bisher unbekannt, daß die Tumormäuse im Zusammenhang mit der synergistischen Wirkung spontan verendeten. Dabei scheint es sich um eine ungeklärte biologische Wirkung zu handeln, das vielleicht durch eine Superinfektion mit Bakterien oder anderem Virus zu erklären ist. Keinesfalls ist eine besondere LDH-Virus-bedingte Wachstumssteigerung des Tumorgewebes zur Erklärung dieses sich in wenigen Tagen entwickelnden Phänomens anzuführen.

TABELLE 12a

	Virus-infizierte Tumormäuse								Virus-infizierte tumorfreie Mäuse										
	Versuchstiere		1		2		3		4		5		6		7		8		
Leerwerte		42	108	84	65	97	43	29	44	62,6	27,1	48	26	32	21	22	24	20	
Tage nach Infektion																			
2		280	530	325	270	180	190	210	205	273,8	133,1	130	235	120	130	155	100	115	180
4		430	920	440	315	175	250	305	300	394,3	173,75	200	200	115	170	185	165	160	195
6		-	-	435	345	225	305	305	265	313,3	216,25	245	180	210	200	340	140	190	225
8		-	-	530	405	165	400	265	330	349,1	253,1	300	370	280	250	200	210	180	235
10		-	-	400	-	200	160	470	280	302	197,1	205	195	100	195	300	200	185	-
13		-	-	360	-	200	270	-	200	257,5	175	175	225	170	155	135	155	160	225
15		-	-	530	-	180	210	-	300	305	201,9	160	210	175	180	250	230	150	260

Tabelle 12 a: Ergänzung zur Tabelle 12 mit Angabe der Serum-LDH-Änderung bei den einzelnen Tumormäusen und den tumorfreien Mäusen.
Fortlaufende Beobachtung der 8 Tumormäuse und 8 Kontrollmäuse über 15 Tage.

2) Infektionstiter bei LDH-Virus-infizierten Tumormäusen

Die nach Infektion mit dem Riley-Virus gefundenen unterschiedlichen Fermentreaktionen zwischen Tumor- und Kontrolltieren ließen an eine besondere Virusvermehrung in den Tumorzellen denken. Deshalb wurde erstens die Infektiosität des Virus in den Tumoren bestimmt, zweitens wurden die Infektionstiter in den Organen Leber und Milz sowie im Serum der Tumortiere mit denen von Kontrollmäusen verglichen. Dazu wurden am 15. Tage des oben geschilderten Versuches die genannten Substrate zu zellfreien Extrakten verarbeitet und ihr infektiöser Titer in einfachen geometrischen Verdünnungsreihen untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, daß die infektiösen Titer der Substrate aus Tumor- und Kontrolltieren bedeutend höher lagen als der Titer des Ausgangsmaterials von Sa I, mit dem die Tumor- und Kontrolltiere beimpft worden waren. Für eine Anreicherung des LDH-Virus in Tumortieren spricht, daß der infektiöse Titer des Serumfiltrates aus Kontrolltieren $2,5 \times 10^5$ betrug, während das Serumfiltrat der Tumortiere noch in einer Verdünnung von 5×10^5 einen deutlichen LDH-Effekt im Serum der Empfängertiere auslöste (Tabelle 13). Es ist fraglich, ob durch diese geringe Anreicherung des Virus in Tumortieren der synergistische Effekt erklärt werden kann. Einschränkend muß auch erwähnt werden, daß solche geringfügigen Titerschwankungen in biologischen Schwankungen im Nachweissystem begründet sein können. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von NOTKINS u. GREENFIELD, (35) von größter Wichtigkeit, die angeben, daß der Infektionstiter trotz der starken Fermentunterschiede zwischen Tumor- und Kontrolltieren gleich ist. Dies würde eine besondere Reaktion von Tumormäusen auf gleichen Virusgehalt bedeuten.

TABELLE 13

	Verdünnung der untersuchten Gewebe							
	4×10^3	8×10^3	$1,6 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
Ausgangs- Virus	pos.	neg.	-	-	-			
Tumoren	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	-	-
Organe infiz. Tu- mortiere	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	-	-
Serum infiz. Tu- mortiere	-	-	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
Organe infiz. Kon- trollen	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	-	-
Serum infiz. Kon- trollen			pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.

Tabelle 13: Bestimmung der Infektiosität von LDH-Virus in Tumoren, Organen und Serum von Spontantumor-tragenden Mäusen am 15. Tage nach Infektion mit dem LDH-Virus. Vergleich dieser Infektionstiter mit denen von Kontrollmäusen.

Leider konnten wir die nur einmal nachgewiesene Virusanreicherung in Tumoren nicht durch die Bestimmung der Infektiosität weiterer Substrate untermauern. Es zeigte sich nämlich, daß unsere zunächst bis zum Gebrauch eingefrorenen hochverdünnten Viruslösungen durch das Einfrieren ihre Wirksamkeit auf den LDH-Spiegel eingebüßt hatten, was bereits im Kapitel C, Abschnitt 2 erwähnt wurde; durch spätere Untersuchungen von PRECHTEL (Dissertation München 1965) wird dies eingehend belegt. Dadurch konnte die obere infektiöse Grenze der verschiedenen Substrate von Tumor- und Kontrolltieren nicht erfaßt werden.

Das von RILEY als synergistischer Effekt bezeichnete Verhalten zwischen dem LDH-Virus und virusfreien Tumortieren konnte also durch unsere Ergebnisse mit gewissen Einschränkungen bestätigt werden. In der Literatur wird die unterschiedliche Fermenthöhe damit erklärt, daß das Virus eine induzierende Wirkung auf den Tumor

hinsichtlich seines Wachstums und seiner Malignität hat (RILEY, 42, 43; RILEY et al., 48, 49) und der Tumor wiederum den LDH-Spiegel mit beeinflußt. Eine zweite Erklärung für den synergistischen Effekt bestünde in der Annahme, daß das Virus im rasch wachsenden Tumorgewebe besonders günstige Bedingungen für seine Vermehrung findet und damit eine Anreicherung stattfindet; in unseren Versuchen würde der höhere infektiöse Titer im Serum der Tumortiere dafür sprechen. Eine weitere Möglichkeit für die Auslösung dieses Effektes wäre der Synergismus zwischen Viren und Rickettsien (FRANCIS, 11) oder zwischen 2 Viren (RUBIN u. VOGT, 55; STEWART, 57), einmal dem LDH-Virus, zum anderen einem noch unbekannten Agens in diesen Tumoren, wie aus Befunden von ADAMS et al., (1) und RILEY (45) zu schließen ist.

3) Wirkung von Tumorextrakten plus LDH-Virus auf tumorfreie Mäuse

In einem 3. Experiment wurde geprüft, ob ein bestimmter übertragbarer Faktor des Tumorgewebes gemeinsam mit dem LDH-Virus einen verstärkten Fermentanstieg auszulösen vermag. Deshalb wurde Mäusen gleichzeitig virusfreier Tumorextrakt und LDH-Agens aus dem Transplantationstumor Sa I (Landschütz-Sarkom) injiziert. Als Kontrollversuch wurde eine Gruppe normaler Swiss-NMRI-Mäuse nur mit LDH-Agens infiziert. Der Ferment Spiegel im Serum der Tiere wurde über einen Zeitraum von 26 Tagen mehrmals bestimmt. Die Ergebnisse zeigten keinen Unterschied im Anstieg der Serumfermente zwischen den beiden Tiergruppen. Dies bedeutet, daß Spontantumoren keinen übertragbaren subzellulären Faktor enthalten, der den Ferment Spiegel mit beeinflussen würde.

ZUSAMMENFASSUNG

Nur einzelne Tumormäuse reagierten mit dem von RILEY sogenannten Virus-Tumor-Synergismus. Dabei war besonders bemerkenswert, daß die Tumormäuse mit den höchsten LDH-Werten kurz nach Versuchsbeginn verendeten. Der gültige Nachweis der Virusanreicherung in Tumormäusen mißlang, da das Virus durch Einfrieren in den höchsten Verdünnungschargen verloren ging. Für eine Anreicherung des Virus in Tumormäusen spricht aber die Beobachtung, daß die Infektiosität des Serumfiltrates von Tumormäusen doppelt so hoch war wie die von Kontrolltieren.

Mäuse mit Spontantumoren enthalten kein übertragbares subzelluläres Agens im Tumorgewebe, das den Ferment Spiegel gemeinsam mit dem LDH-Virus beeinflussen könnte.

F) KONTROLLVERSUCH MIT POLIOMYELITIS- UND POLYOMA-VIRUS

Zu Beginn unserer Untersuchungen wußten wir so wenig über das Wesen des LDH-Virus, daß durchaus mit der Möglichkeit zu rechnen war, verschiedene Virusarten könnten den ohne weitere wahrnehmbare Veränderungen (GEORGII, 14; GEORGII et al., 15) ablaufenden LDH-Effekt verursachen. Deshalb wurde die Wirkung von Poliomyelitis- und Polyoma-Virus, eines apathogenen und eines pathogenen Agens, auf den Serumspiegel von LDH bei Mäusen untersucht.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1) Kulturflüssigkeit von Poliomyelitis-Virus des Stammes A wurde in Verdünnungsreihen von 1:2 bis 1:16 jeweils 3 Mäusen des Stammes NMRI injiziert. Keines dieser Tiere zeigte im Verlaufe mehrerer LDH-Messungen einen Fermentanstieg.

2) Während nach Infektion mit Polyoma-Virus (Graffi-Polyoma-Virus BTT-2) aus einigen Kulturpassagen (K 9, K 10, K 12) der LDH-Spiegel der Empfängertiere unbeeinflusst blieb und die histologische Untersuchung von Leber und Milz dieser Tiere keine Veränderungen zeigte, trat bei den Mäusen, die mit Polyoma-Virus aus den Kulturpassagen K 11 und K 17 infiziert worden waren, zwischen dem 4. und 6. Tage ein außerordentlich starker LDH-Effekt auf. Alle Tiere verendeten zwischen dem 4. und 6. Tage; die Seren dieser Tiere waren ikterisch. Die histologische Untersuchung der Leber und Milz ergab schwere diffuse Nekrosen in beiden Organen. Für diese Veränderungen spielte die Dosis, die den Mäusen injiziert worden war, - sie betrug zwischen 0,1 und 0,3 ml - keine Rolle.

Der starke LDH-Effekt bei diesen Tieren war nicht durch eine Wirkung des Polyoma-Virus auf den Fermentspiegel zu erklären, sondern eine Folge der histologisch nachgewiesenen Leber- und Milznekrosen. Diese histologischen Befunde entsprechen am ehesten der Wirkung von Ektromelie-Virus, wie sie bei gezielten Untersuchungen in diesem Labor festgestellt wurden (GEORGII, nicht veröffentlicht). Auch KIKUTH u. GÖNNERT (26) fanden bei der Erzeugung von Ektromelie durch Provokation die gleichen Nekrosen. Dies bedeutet, daß weder das Polyoma-Virus, wie auch ADAMS et al. (1) feststellten, noch das Poliomyelitis-Virus eine spezifische Wirkung auf den LDH-Spiegel ausüben. Lediglich im Influenza-Virus-beimpften Hühnerei oder in der mit Vaccine-Virus beimpften Zellkultur fanden KELLY u. GREIFF (25) einen Anstieg der LDH, proportional der Virusvermehrung. Ansonsten kommt diese Fähigkeit anscheinend nur einem bestimmten Virus oder einer Familie von Viren zu (RILEY, 51), die in allen Transplantationsgeschwülsten vorhanden ist (RILEY et al., GEORGII et al., RAUEN u. HUPE, 41).

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Infektion mit Poliomyelitis- und Polyoma-Virus blieb der LDH-Spiegel im Serum von Empfängertieren unbeeinflusst. LDH-Erhöhen nach Injektion einiger Polyoma-Virus-Chargen wurden durch Leber- und Milznekrosen verursacht. Diese waren Folge einer Verunreinigung mit Ektromelie-Virus.

G) ZUSAMMENFASSUNG ALLER ERGEBNISSE

In 2 Transplantationsgeschwülsten der Maus unseres Institutes wurde LDH-Virus nachgewiesen, das im Tumorascites, im soliden Tumorgewebe und in den Organen Leber und Milz, sowie im Serum der Tumortiere enthalten ist. Durch zellfreie Übertragung auf Empfängertiere und fortlaufende zellfreie Passagen mit den Organextrakten oder mit Serum wurde der entscheidende Beweis für die Virusnatur geführt. Als günstigste Periode der Übertragung wurde der 6-tägige Abstand der Virus-Passagen gefunden. Weiter wurden Hinweise für die Kälteempfindlichkeit des Virus gefunden, weil nach Einfrieren verdünnter Lösungen die Infektiosität verloren ging.

Die Untersuchung von 28 Spontantumoren der beiden Mäusestämme NMRI und C3H ergab trotz Aktivierungsversuchen in Blindpassagen keinen Hinweis für ein verborgenes LDH-Virus.

Der von RILEY beschriebene synergistische Effekt zwischen Virus und Tumorgewebe konnte nur teilweise nachgewiesen werden, wobei auffiel, daß Tiere mit den höchsten LDH-Werten 4-6 Tage nach der Infektion verendeten.

Kontrollversuche mit Poliomyelitis- und Polyoma-Virus ergaben keine Wirkung dieser Viren auf den LDH-Spiegel von Empfängertieren.

ADDENDUM

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft verdanken wir die wesentlichen Sachmittel und Geräte, die für die Untersuchungen verwendet und im Rahmen des Forschungsvorhabens Ge 121/2 gewährt wurden.

Herrn Professor Dr. A. GRAFFI, Deutsche Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch, verdanken wir sein Polyoma-Virus BTT-2.

Herrn Dr. Otmar GOETZ, Universitäts-Kinderklinik München, verdanken wir das Poliomyelitis-Virus.

Fräulein Edith HARDT und Fräulein Gisela BACHL verdanken wir mancherlei technische Hilfe im Laboratorium.

Zum Schluß meiner Arbeit danke ich Herrn Dr. A. GEORGII für die Anregung und Leitung der Arbeit.

LITERATUR

- 1) ADAMS, D. H. , K. E. K. ROWSON and M. H. SALAMAN: The effect of tumors, of leukemia and of some viruses associated with them on the plasma lactic dehydrogenase activity of mice.
Brit. J. Cancer 15, 860 (1961).
- 2) BAYERLE, H. A. , A. GEORGII u. K. E. RICHARD: Über die Aktivität von Serumfermenten nach zellfreier Beimpfung mit Ehrlichschem Mäusetumorscites.
Klin. Wschr. 40, 920 (1962).
- 3) BIERMANN, H. R. , B. R. HILL, L. REINHARDT and E. EMORY: Correlation of Serum lactic dehydrogenase activity with the clinical status of patients with cancer, lymphomas and the leukemias.
Cancer Res. 17, 660 (1957).
- 4) BLADEN jr. , H. A. and A. L. NOTKINS: Electron microscopic demonstration of the lactic dehydrogenase agent.
Virology 21, 269 (1963).
- 5) BLANCHER, M. C. , P. T. GREEN, J. P. Mac LEAN and M. J. HOLLENBERG: Plasma lactic dehydrogenase and phosphohexose-isomerase in leukemia.
Blood 13, 245 (1958).
- 6) CRISPENS, C. G. : A lactic dehydrogenase elevating agent in association with human neoplasms.
Nature (Lond.) 199, 1202 (1963).
- 7) CRISPENS, C. G. : Serum lactic dehydrogenase levels in mice during the development of autochthonous and chemically induced tumors.
J. nat. Cancer Inst. 30, 361 (1963).
- 8) CRISPENS, C. G. : Factors, which influence normal values for serum lactic dehydrogenase in mice.
Experientia 19, 97 (1963).
- 9) CRISPENS, C. G. : On the epizootiology of the lactic dehydrogenase agent.
J. nat. Cancer Inst. 32, 497 (1964).
- 10) ERICKSON, R. J. and D. R. MORALES: Clinical use of lactic dehydrogenase.
New Engl. J. Med., 265, 478, 531 (1961).
- 11) FRANCIS, T. , Jr. : In viral and rickettsial infections of man:
Ed. T. M. Rivers and F. C. Horsfall, 3rd Ed, 1959, 634.
- 12) FRIEND, C. and F. WROBLEWSKI: Lacticdehydrogenase activity of serum in mice with transplanted leukemia.
Science, 124, 173 (1956).

- 13) GEORGII, A.: Über das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus in Laboratoriumsgeschwülsten der Maus.
Klin. Wschr. 42, 559 (1964).
- 14) GEORGII, A.: Die Aktivitätsänderung der Lactatdehydrogenase im Serum nach Infektion mit Geschwulstvirus der Maus als Regulationsstörung in vivo.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 46, 357 (1962).
- 15) GEORGII, A., H. BAYERLE, D. BRDICZKA u. H. ZOBL: Über ein die Lactatdehydrogenase im Serum aktivierendes Virus aus Geschwülsten der Maus. Z. Krebsforsch. 65, 334 (1963).
- 16) GEORGII, A., M. JÄGER, H. KROTH u. H. BAYERLE: Aktivitätsänderungen der Lactatdehydrogenase im Mäuseplasma durch Beimpfung mit virushaltigen Geschwulstfiltraten oder virushaltigen Gewebekulturen.
Experientia (Basel) 18, 71 (1962).
- 17) GEORGII, A., H. KROTH u. H. BAYERLE: Weitere Untersuchungen über die Aktivierung der Lactatdehydrogenase im Serum durch ein Geschwulstvirus der Maus.
Klin. Wschr. 40, 363 (1962).
- 18) GEORGII, A. u. I. LENZ: Failure to propagate a lactic dehydrogenase-elevating agent from mice tumors in mice embryo cultures.
Nature (Lond.) (im Druck).
- 19) GEORGII, A., I. LENZ u. H. ZOBL: Penetration of the placental barrier by the lactate dehydrogenase-elevating virus (Riley) and its behaviour in mouse embryo cultures following infection in utero.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 322 (1964).
- 20) HAAGEN, E.: Die Papageienkrankheit (Psittacosis).
Viruskrankheiten, 2. Bd., 1. Teil, Gustav Fischer, Jena (1939).
- 21) HILL, B. R. and R. T. JORDAN: Serum lactic dehydrogenase activity in mice with transplantable leukemia.
Cancer Res. 17, 144 (1957).
- 22) HILL, B. R. and C. LEVI: Elevation of a serum component in neoplastic diseases.
Cancer Res. 14, 513 (1954).
- 23) HORSFALL, F. L., R. G. HAHN and E. R. RICKARD: Four recent influenza epidemics: an experimental study.
J. clin. Invest. 19, 379 (1940).
- 24) HSIEH, K. M. and H. T. BLUMENTHAL: Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. , 91, 626 (1956).

- 25) KELLY, R. and D. GREIFF: The level of lactic dehydrogenase activity as an indicator of the growth of influenza virus in the embryonic egg.
J. exp. Med. 113, 125 (1961).
- 26) KIKUTH, W., R. GÖNNERT: Erzeugung von Ektromelie durch Provokation.
Arch. Virusforschung, 1, 295 (1940).
- 27) LENTA, S. M. P. and S. M. A. RIEHL: Dehydrogenase studies of tissue from normal and tumor bearing mice.
II. Lactic and malic dehydrogenases.
Cancer Res. 9, 47 (1949).
- 28) MAHY, B. W., C. W. PARR and K. E. K. ROWSON: Increased plasma isomerase and transaminase activity in mice infected with lactic dehydrogenase-elevating virus.
Nature (Lond.) 198, 885 (1963).
- 29) MANSO, C., K. SUGIURA and F. WROBLEWSKI: Glutathione reductase and lactic dehydrogenase activities of tissue of rodents with transplanted tumors.
Cancer Res. 18, 682 (1958).
- 30) MEYER, K. F.: Pigeons and born yard fowls as possible sources of human psittacosis or ornithosis.
Schweiz. med. Wschr. 71, 1377 (1941).
- 31) MEYER, K. F. and B. EDDI: Spontaneous ornithosis (psittacosis) in chickens the cause of human infection.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 49, 522 (1942).
- 32) MOORE, A. E. and F. WROBLEWSKI: Lactic dehydrogenase production in tissue culture of normal, transformed and malignant human cell line.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 782 (1958).
- 33) MUNDY, J. and P. C. WILLIAMS: Transmissible agent associated with some mouse neoplasms.
Science 134, 834 (1961).
- 34) NOTKINS, A. L., R. J. BERRY, J. B. MOLONEY and R. E. GREENFIELD: Relationship of the lactic dehydrogenase factor to certain murine tumors.
Nature (Lond.) 193, 79 (1962).
- 35) NOTKINS, A. L. and R. E. GREENFIELD: Infection of tumor-bearing mice with the lactic-dehydrogenase agent.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 109, 988 (1962).
- 36) NOTKINS, A. L., R. E. GREENFIELD, D. MARSHALL and L. BANE: Multiple enzyme changes in the plasma of normal and tumor-bearing mice following infection with the lactic-dehydrogenase agent.
J. exp. Med. 117, 185 (1963).

- 37) NOTKINS, A. L. and S. J. SOCHAT: Studies on the multiplication and the properties of the lactic dehydrogenase agent.
J. exp. Med. 117, 735 (1963).
- 38) NOTKINS, A. L. and C. SCHEELE: Studies on the transmission and excretion of the lactic dehydrogenase agent.
J. exp. Med. 118, 7 (1963).
- 39) PLAGEMANN, P. G. W., M. WATANABE and H. E. SWIM: Plasma lactic dehydrogenase-elevating agent of mice: Effect of levels of additional enzymes.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 111, 749 (1962).
- 40) PLAGEMANN, P. G. W. and H. E. SWIM: Studies of the plasma lactic dehydrogenase-elevating virus of mice.
Proc. Am. Ass. Ca. R. 4, 207 (1963).
- 41) RAUEN, H. M. u. H. HUPE: Das Lactatdehydrogenase-Agens im Blute tumor-tragender Mäuse.
Arzneimittelforschung (Drug Res.) 13, 1933 (1963).
- 42) RILEY, V.: Virus-Tumor synergism.
Science 134, 666 (1961).
- 43) RILEY, V.: Synergistic glycolytic activity associated with transmissible agents and neoplastic growth.
J. gen. Physiol. 45, 614 (1962).
- 44) RILEY, V.: Evidence for a minute infectious entity.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 4, 57 (1963).
- 45) RILEY, V.: Comparison of a lactate dehydrogenase elevating virus and eperythrozoon coccoides.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 486 (1964).
- 46) RILEY, V.: Adaptation of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 751 (1960).
- 47) RILEY, V., E. HUERTO, F. LILLY, D. BARDELL, J. D. LOVELESS and M. A. FITZMAURICE: Some characteristics of virus-like entities associated with thirty varieties of experimental tumors.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 261 (1961).
- 48) RILEY, V., E. HUERTO, J. D. LOVELESS, D. BARDELL, M. FITZMAURICE and C. FORMAN: Inapparent transmissible agents in oncology and their influence on tumor and host.
Acta Un. int. Cancer 19, 263 (1963).

- 49) RILEY, V., E. HUERTO, J.D. LOVELESS, D. BARDELL, M. FITZMAURICE and C. FORMAN: Role of viruses in the biochemical and pathological behaviour of tumor and host.
VIII. Intern. Cancer Congr. Moscow 1962.
- 50) RILEY, V., F. LILLY, E. HUERTO and D. BARDELL: Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasma.
Science 132, 545 (1960).
- 51) RILEY, V., J.D. LOVELESS, M. FITZMAURICE and M.L. EIDINOFF:
Preliminary studies on size of lactic dehydrogenase elevating virus-like agents.
(Im Druck)
- 52) RILEY, V. and F. WROBLEWSKI: Serial lactic dehydrogenase activity in plasma of mice with growing or regressing tumors.
Science 132, 151 (1960).
- 53) ROWSON, K.E.K., D.H. ADAMS and M.H. SALAMAN: Rileys enzyme elevating virus: A study of the infection in mice and its relation to virus induced leukemia.
VIII. Intern. Cancer Congr. Moscow 1962.
- 54) ROWSON, K.E.K., B.W.J. MAHI and M.H. SALAMAN: Size estimation by filtration of the enzyme elevating virus of Riley.
Life Sci. 7, 479 (1963).
- 55) RUBIN, H. and P.K. VOGT: An avian leukosis virus associated with stocks of Rous sarcoma virus.
Virology 17, 184 (1962).
- 56) SCHWARTZ, M.A., M. WEST, W.S. WALSH and H. ZIMMERMANN:
Serum enzymes in disease. VIII. Glycolytic and oxydative enzymes and transaminase in patients with gastrointestinal carcinoma.
Cancer (Philad.) 15, 346 (1962).
- 57) STEWART, S.E., Gustav Stern Symposium, 1964. Perspectives in Virology IV.
- 58) TSRIMBAS, A., K. KRIKELLIS u. W. STICH: Über die Heterogenität der Serum-Lactatdehydrogenase bei menschlichen Leukämien.
Klin. Wschr. 40, 878 (1962).

LEBENS LAUF

Am 11. Juni 1938 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Hermann Zobl und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Scheidig, in Weimar geboren. Die ersten Volksschulklassen besuchte ich in Apolda, Thüringen. Im Jahre 1946 zogen wir nach Kiefersfelden um. Dort besuchte ich die 3. und 4. Volksschulklasse und trat dann in das Human. Gymnasium in Rosenheim ein, wo ich 1958 das Abitur bestand. Im Herbst desselben Jahres begann ich in München mit dem Studium der Medizin. 1959 bestand ich das Vorphysikum, 1961 das Physikum. Nach 11 Studiensemestern legte ich am 30. 7. 1964 in München das Staatsexamen ab. Seit dem 1. 10. 1964 bin ich als Medizinalassistent in der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Bamberg tätig.

